



دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع دکتری تخصصی باکتری شناسی پزشکی

عنوان:

بررسی اثر غلظت زیر حد بازدارندگی کسری رشد (Sub-Fractional Inhibitory Concentration) سفتازیدیم در ترکیب با ونکومایسین یا کلیندامایسین بر برخی از ژن های مؤثر در ویرولانسی، اسپورزایی و زایش اسپور کلستریدیوم دیفیسیل

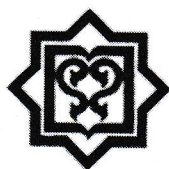
توسط: ابراهیم رضازاده زرنیدی

استاد راهنما: دکتر محمد مرادی

استاد مشاور: دکتر شهلا منصوری - دکتر نوذر نخعی

دکتر فرهاد صراف زاده

سال تحصیلی: ۱۳۹۶-۱۳۹۷



Kerman University of Medical Sciences

Faculty of Medicine

In Partial Fulfillment of the Requirements for the

Degree Ph.D in: Medical Bacteriology

Title:

**The Effects of Sub-Fractional Inhibitory Concentration (Sub-FIC) of
Ceftazidime in Combination with Vancomycin or Clindamycin on some
of Virulence Genes, Sporulation and Spore Germination of *Clostridium
difficile***

By: Ebrahim Rezazadeh Zarandi

Supervisor:

Dr. Mohammad Moradi

Advisers:

- 1- Dr. Shahla Mansouri**
- 2- Dr. Nowzar Nakhaee**
- 3- Dr. Farhad Sarafzadeh**

Year: 2017



سفتازیدیم در ترکیب تولید اسپور و زایش اسپور را در اغلب ایزوله‌های بالینی و سویه استاندارد ATCC 9689 در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت مهار کردند. ضمناً ترکیبات سفتازیدیم به شکل تنها و در ترکیب با ونکومایسین و یا کلیندامایسین سبب کاهش بیان ژن‌های *slpA*، *tcdB*، *tcdA* و مهار تولید توکسین در غلظت‌های زیر حد بازدارندگی رشد در زمان ۲۴ ساعت شدند. کاهش بیان و مهار تولید توکسین در غلظت‌های زیر حد بازدارندگی رشد ونکومایسین و کلیندامایسین در ۴۸ ساعت ادامه یافت. در این زمان سفتازیدیم و ترکیب آن با ونکومایسین و کلیندامایسین سبب افزایش بیان ژن‌های *slpA*، *tcdB*، *tcdA* و تولید توکسین شدند.

نتیجه‌گیری: فراوانی اسهال مرتبط با کلستریدیوم دیفیسیل در بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان شهید باهنر کرمان ۴/۷٪ (۱۱ مورد) بود که تقریباً، مشابه کشورهای آسیایی و بیشتر از کشورهای صنعتی است. سفالوسپورین‌ها مانند سفتازیدیم که به شکل گسترده در بیماران بستری در بیمارستان استفاده می‌شوند، در القای عفونت کلستریدیوم دیفیسیل نقش بسیار مهمی دارند. این مطالعه نشان داد که سفتازیدیم به شکل تنها و در ترکیب در مقایسه با ونکومایسین و کلیندامایسین (به شکل تنها) سبب افزایش بیان ژن‌های توکسین و پروتئین لایه سطحی A می‌گردد. سفالوسپورین‌ها به شکل تنها و یا ترکیب با دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها با افزایش بیان ژن‌های مؤثر در بیماری‌زایی (توکسین بیشتر و اسپور بیشتر) سبب افزایش شدت و احتمالاً گسترش عفونت کلستریدیوم دیفیسیل می‌شوند. از طرفی سفتازیدیم در عملکرد ونکومایسین و کلیندامایسین دخالت می‌کند. مطالعات قبلی نشان داده است که بیمارستان‌هایی که مصرف سفالوسپورین‌ها را به‌طور قابل توجهی کاهش داده‌اند، موارد بروز عفونت کلستریدیوم دیفیسیل در آن‌ها کاهش داشته است. اگرچه اسپورولاسیون، زایش اسپور، تولید توکسین و بیان ژن‌های فاکتورهای ویروالسی بستگی به نوع آنتی‌بیوتیک و ایزوله دارد.

کلمات کلیدی: کلستریدیوم دیفیسیل، بیان ژن، آنتی‌بیوتیک، زایش اسپور، اسپورزایی

Abstract

Introduction: *Clostridium difficile* (*C.difficile*) is an obligate, anaerobic spore-forming bacterium that infection is caused in the presence of antibiotic in gut. The bacterium consists virulence factors which may influence by the sublethal concentration of antibiotics. The effects of antibiotics in the sub-MIC have reported on the toxin production and virulence genes expression. It has been reported that *C. difficile* associated diarrhea have increased in the patients who received combination therapy.

In this research, besides the prevalence of *C. difficile* in the diarrhea samples which collected from intensive care unit (ICU) of Shahid Bahooonar hospital, Kerman, the effect of ceftazidime (CAZ) alone and in combination with vancomycin (VAN) and clindamycin (CLI) were evaluated in the sub-MIC on the spore production, spore germination, toxin A, B and *slpA* gene expression and toxin production of *C. difficile*.

Methods: About 233 diarrhea samples were gathered from diarrhea ICU hospitalized patients. The samples were cultivated on *Clostridium difficile* medium. Bacterial isolates were confirmed as *C. difficile* based on the odor, Sub-terminal spore, and *16S rDNA* gene amplification. Four clinical isolates and one standard strain ATCC 9689 were selected for further investigations. MIC (VAN, CLI, and CAZ) and FIC (VAN plus CAZ and CLI plus CAZ) of four clinical isolates and ATCC 9689 strain were determined by microdilution and checkerboard microdilution method, respectively. The appropriate concentration of antibiotics alone ($\frac{1}{2} \times \text{MIC}$) and in combination ($\frac{1}{2} \times \text{FIC}$) were added to the tubes containing pre-reduced medium. Then $\sim 10^6$ CFU/mL fresh bacteria were inoculated into the tubes and incubated in anaerobic jar at 37 °C. The number of spores, toxin production and genes expression (*tcdA*, *tcdB*, and *slpA*) were carried out by colony count, ELISA and Real-time PCR methods in triplicate, respectively.

Results: From the 233 diarrheal samples were gathered from ICU, *C. difficile* isolated from 21% of them. Based on toxin assay by ELISA method, about 22.5% of *C. difficile* isolates were toxigenic. Four clinical isolates and ATCC 9689 strain were selected for further investigations. VAN inhibited spore production in the all isolates and ATCC 9689 strain. The other antibiotics alone and in combination suppressed spore production in majority of isolates (except A+/B+/CDT+). The antimicrobial agents down-regulated *cdtA*, *cdtB* and *slpA* genes expression in sub-MIC of antibiotics alone and in

combination within 24 hours periods. Down-regulation of genes expression continued in the sub-MIC of VAN, and CLI in the periods of 48 hours. At this time, CAZ and its combination with VAN and CLI increased *cdtA*, *cdtB* and *slpA* genes expression.

Conclusion: The frequency of *C. difficile* associated diarrhea in ICU hospitalized patients in this study was about 4.7% (11 cases) which is similar to Asia region and more than industrial countries reports. Cephalosporins such as CAZ are prescribed frequently for hospitalized patients. They are important agents in the induction of *C. difficile* infection (CDI). The results showed CAZ (alone and in combination) in comparison to VAN, and CLI increased toxins and *slpA* genes expression and confirms that cephalosporins with overexpression of virulence factors enhance the severity and spread of CDI. Meanwhile, CAZ interferes with the function of VAN and CLI. In the previous studies it has been shown that hospitals have reduced the use of cephalosporins, markedly decreased the incidence of CDI. Although, sporulation, germination, toxin production and virulence factors genes expression are related to the type of antibiotic and isolates.

Keywords: *Clostridium difficile*, Gene expression, Antibiotic, Germination and Sporulation.